

Rec'd PCT/PTO 24 JAN 2005

Dated: _____

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Examiner: Not Yet Assigned

{W:\09859\0202424US0\00347441.DOC 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 }

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED

OCT - 6: 2003

WPB JD

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
6-1, Ohtemachi 1-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185
Japan

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 25 September 2003 (25.09.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 1499	
International application No. PCT/JP03/09459	International filing date (day/month/year) 25 July 2003 (25.07.03)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 25 July 2002 (25.07.02)
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
25 July 2002 (25.07.02)	2002-217159	JP	12 Sept 2003 (12.09.03)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.70.10

Authorized officer

Farid ABBOU

Telephone No. (41-22) 338 8169

10/522658

PCT/JP03/09459

Rec'd PCT/PTO 24 JAN 2005

25.07.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 12 SEP 2003

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 7 月 2 5 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 2 1 7 1 5 9
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 2 - 2 1 7 1 5 9]

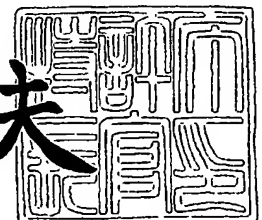
出 願 人 協和醗酵工業株式会社
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 8 月 2 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 H14-0772A4

【提出日】 平成14年 7月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 19/00

【発明者】

 【住所又は居所】 山口県防府市協和町 1 番 1 号 協和醗酵工業株式会社
 生産技術研究所内

 【氏名】 村田 英城

【発明者】

 【住所又は居所】 山口県防府市協和町 1 番 1 号 協和醗酵工業株式会社
 生産技術研究所内

 【氏名】 米満 寛之

【特許出願人】

 【識別番号】 000001029

 【氏名又は名称】 協和醗酵工業株式会社

 【代表者】 平田 正

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 008187

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

 【物件名】 図面 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ユビキノン-10含有溶液の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の工程、

[1] ユビキノン-10を生産する能力を有する微生物を培地に培養して得られる培養物、該培養物の処理物、またはユビキノン-10の粗精製物に、50～100 v/v %の濃度になるようにメタノール溶液を加え、0℃以上30℃以下の温度に保持する工程、

[2] 工程[1] で得られる溶液から不溶物を分離取得する工程、

[3] 工程[2] で得られる不溶物に、85～100 v/v %の濃度のメタノール溶液を加え、30℃より高く80℃以下の温度に保持する工程、および

[4] 工程[3] で得られる溶液から不溶物を除去する工程、
を含むユビキノン-10含有溶液の製造方法。

【請求項2】 請求項1記載の方法の工程[2] で得られる不溶物に、再び50～100 v/v %の濃度になるようにメタノール溶液を加え、0℃以上30℃以下の温度に保持した後、不溶物を分離取得する工程を、1回以上繰り返してから請求項1記載の工程[3]以降の工程を行うことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 ユビキノン-10を生産する能力を有する微生物が、担子菌、真菌、酵母および細菌からなる群より選ばれる微生物である請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 培養物の処理物が、微生物の培養物の濃縮物、該培養物の乾燥物、該培養物から分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体を洗浄して得られる洗浄菌体、該洗浄菌体の乾燥物または該洗浄菌体の凍結乾燥物であることを特徴とする、請求項1または2記載の方法。

【請求項5】 請求項1または2記載の方法で得られるユビキノン-10含有溶液からユビキノン-10の結晶を晶析させることを特徴とするユビキノン-10の結晶の製造方法。

【請求項6】 ユビキノン-10の結晶が、90.0%以上の純度である請求項

5 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ユビキノーン 1 0 を含有する培養物、該培養物の処理物、またはユビキノーン 1 0 の粗精製物から、ユビキノーン 1 0 を分離精製する方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来技術】

ユビキノーン 1 0 は広く動植物の組織、微生物の細胞内に存在し、末端電子伝達系の必須成分として重要な働きをしている。またその薬理作用はうつ血性心不全及び冠不全、栄養障害による筋ジストロフィーなどに有効であり、医薬品としても価値の高い物質である。

【0 0 0 3】

ユビキノーン 1 0 の製造法としては、ユビキノーン 1 0 の含有率が高い微生物を培養して得られる培養物から抽出する方法が一般的である。

該培養物からユビキノーン 1 0 を精製する方法としては、従来から有機溶媒等を用いる抽出法が知られている（特開平11-178595号など）。また、該抽出液からユビキノーン 1 0 を精製する方法としては、シリカゲルまたは活性アルミナを用いる方法（特開昭63-91360号、特開平1-160953号など）が知られている。

【0 0 0 4】

しかしながら、上記抽出法で得られる抽出液は、ユビキノーン 1 0 以外にユビキノーン 1 0 類縁体を多く含み、該抽出液から晶析法により直接、高純度のユビキノーン 1 0 を精製することは困難である。

シリカゲルまたは活性アルミナを用いた方法では、ユビキノーン 1 0 類縁体を多く含む該抽出液を用いた場合、ユビキノーン 1 0 を効率よく分離精製することはできない。さらに、シリカゲルおよび活性アルミナは高価であり、工業規模での製造においては、コスト高につながるという問題もある。

【0 0 0 5】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的はユビキノーン 10 を含有する培養物、該培養物の処理物、またはユビキノーン 10 の粗精製物から、高純度のユビキノーン 10 を安価に分離精製する方法を提供することにある。

【0006】**【課題を解決するための手段】**

本発明者は鋭意検討を行った結果、

- ①ユビキノーン 10 を生産する能力を有する微生物の培養物、該培養物の処理物、またはユビキノーン 10 の粗精製物に含まれる不純物を、0℃以上30℃以下の温度のメタノール溶液を用いて洗浄除去することでメタノール不溶画分を得た後、
- ②該メタノール不溶画分から、30℃より高く80℃以下の温度のメタノール溶液を用いてユビキノーン 10 を抽出・溶解することによって、ユビキノーン 10 類縁体に対するユビキノーン 10 の純度が高いユビキノーン 10 含有溶液を取得することができ、
- ③さらに該溶液を直接、晶析に供することにより高純度のユビキノーン 10 の結晶が取得できることを見いだした。

【0007】

すなわち、本発明は以下の(1)～(6)に関する。

(1) 以下の工程、

[1] ユビキノーン 10 を生産する能力を有する微生物を培地に培養して得られる培養物、該培養物の処理物、またはユビキノーン 10 の粗精製物に、50～100 v/v %の濃度になるようにメタノール溶液を加え、0℃以上30℃以下の温度に保持する工程、

[2] 工程[1]で得られる溶液から不溶物を分離取得する工程、

[3] 工程[2]で得られる不溶物に、85～100 v/v %の濃度のメタノール溶液を加え、30℃より高く80℃以下の温度に保持する工程、および

[4] 工程[3]で得られる溶液から不溶物を除去する工程、

を含むユビキノーン 10 含有溶液の製造方法。

【0008】

(2) 請求項1記載の方法の工程[2]で得られる不溶物に、再び50～100v/v%の濃度になるようにメタノール溶液を加え、0℃以上30℃以下の温度に保持した後、不溶物を分離取得する工程を、1回以上繰り返してから請求項1記載の工程[3]以降の工程を行うことを特徴とする上記(1)の方法。

(3) ユビキノン-10を生産する能力を有する微生物が、担子菌、真菌、酵母および細菌からなる群より選ばれる微生物である上記(1)または(2)の方法。

【0009】

(4) 培養物の処理物が、微生物の培養物の濃縮物、該培養物の乾燥物、該培養物から分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体を洗浄して得られる洗浄菌体、該洗浄菌体の乾燥物または該洗浄菌体の凍結乾燥物であることを特徴とする、上記(1)または(2)の方法。

(5) 上記(1)または(2)の方法で得られるユビキノン-10含有溶液からユビキノン-10の結晶を晶析させることを特徴とするユビキノン-10の結晶の製造方法。

【0010】

(6) ユビキノン-10の結晶が、90.0%以上の純度である上記(5)の方法。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明の方法に用いられるユビキノン-10を生産する能力を有する微生物は、該能力を有する微生物であれば、いずれの微生物でもよいが、例えば、ユビキノン-10を生産する微生物として知られている担子菌、真菌、酵母、および細菌をあげることができる。より具体的には、担子菌としてはUstilago属、真菌としてはAspergillus属、Exobasidium属、Geotrichum属、Monascus属、Paecilomyces属、Sporotrichum属およびTilletiopsis属、酵母としてはAureobasidium属、Brettanomyces属、Bullera属、Candida属、Cryptococcus属、Leucosporidium属、Oosporidium属、Rhodotorula属、Rhodosporium属、Schizosaccharomyces属、Spo

robolomyces属、Torulopsis属、Tremella属、Trichosporon属およびSporidiobolus属、細菌としては、Acetobacter属、Agrobacterium属、Corynebacterium属、Erythrobacter属、Flavobacterium属、Methylobacter属、Microcycclus属、Paraccus属、Phyllobacterium属、Protaminobacter属、Pseudomonas属、Rhizobium属、Rhodobacter属およびXantomonas属に属する微生物等をあげることができる。

【0012】

また、遺伝子組換え等の手法により、ユビキノン合成酵素が強化されたEscherichia属に属する微生物、および該酵素が強化された上記のユビキノン-10を生産する能力を有する微生物も本発明の方法に用いることができる。

上記の微生物を培養するための培地としては、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、該微生物の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0013】

炭素源としては、該形質転換体が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

【0014】

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常 16時間～ 14日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持することが好ましい。 pHの調整は、無機または有機の酸、アル

カリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

【0015】

培養が終了した培養物は、そのまま本発明の精製方法に用いることができ、該培養物の処理物もまた、本発明の精製方法に用いることができる。

該培養物の処理物としては、該培養物の濃縮物、該培養物の乾燥物、該培養物から分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体を洗浄して得られる洗浄菌体、該洗浄菌体の乾燥物または該洗浄菌体の凍結乾燥物等をあげることができる。

【0016】

上記洗浄菌体とは、ユビキノーン-10を実質的に溶解しない溶媒で洗浄した洗浄菌体であり、例えば該溶媒を用いて1～10回、好ましくは2～7回、さらに好ましくは3～5回、洗浄して得られる菌体をあげることができる。

上記洗浄に用いられる溶媒としては、水が好適に用いられる。

なお、本発明において、ユビキノーン-10を実質的に溶解しないとは、ユビキノーン-10の工業的精製法において許容される程度のユビキノーン-10の溶解性はあってもよいことを意味し、具体的にはユビキノーン-10に対する溶解度が0.05%以下、より好ましくは0.02%以下、さらに好ましくは0.01%以下であることをいう。

【0017】

微生物の菌体は、培養物をろ過、遠心分離、膜分離などの分離操作、好ましくは遠心分離操作によって得ることができる。ろ過は、ヌツチェ、フィルタープレス、バスケット分離機などで行うことができる。

上記培養物および培養物の処理物は、凍結して保存し、必要なときに融解して用いることもできる。

【0018】

本発明の方法により、上記培養物、該培養物の処理物からユビキノーン-10を精製することができるほか、ユビキノーン-10の粗精製物からユビキノーン-10を精製することもできる。

ユビキノーン-10の粗精製物としては、ユビキノーン-10類縁体が多く含まれ

るユビキノーン10含有溶液、乾燥物、凍結乾燥物または晶析物等をあげることができるが、それらの取得方法はいずれの方法であってもよく、例えば、ユビキノーン10を生産する能力を有する微生物を培養して得られる培養物から従来の方法に従い、有機溶媒等を用いてユビキノーン10を抽出する方法、該抽出液を乾燥または凍結乾燥する方法、および該粗抽出方法により得られた抽出液を晶析する方法等をあげることができる。

【0019】

ユビキノーン10類縁体が多く含まれるユビキノーン10含有溶液等としては、95重量部のユビキノーン10に対し、ユビキノーン10類縁体が5重量部以上含まれるユビキノーン10含有溶液等をあげることができる。

ユビキノーン10類縁体としては、3-デメトキシユビキノーン10等のユビキノーン10構造類縁物、およびスフェロイデン等のカロテノイド類などをあげることができる。

【0020】

本発明の方法で用いられるメタノール溶液としては、メタノールおよびメタノール水溶液をあげることができる。また、メタノールに他の有機溶媒等を添加して得られるメタノール溶液もまた、本発明の目的を達成することができる限りにおいて、本発明の方法で用いられるメタノール溶液としてあげることができる。

上記の方法で得られる微生物の培養物若しくは該培養物の処理物、またはユビキノーン10の粗精製物に50～100 v/v%の濃度になるようにメタノール溶液を加え、0℃以上30℃以下の温度に保持することにより、ユビキノーン10高含有不溶物を取得することができる。上記メタノール溶液の濃度と温度は、メタノール溶液が該濃度および温度においてユビキノーン10を実質的に溶解しない濃度と温度の組み合わせであれば、いかなる濃度と温度の組み合わせであってもよい。例えば、メタノール溶液としてメタノールまたはメタノール水溶液を用いる場合、濃度が50～100 v/v%で温度が0～30℃、より好ましくは濃度が70～100 v/v%で温度が10～20℃、さらに好ましくは濃度が80～100 v/v%で温度が20℃の組み合わせをあげることができる。

【0021】

上記濃度と温度で培養物等を含む溶液を保持する方法としては、例えば攪拌機で30分間～10時間、好ましくは1～5時間、さらに好ましくは1～2時間攪拌する方法をあげることができる。該方法により、該培養物等に含まれるユビキノーン10以外のユビキノーン10類縁体をメタノール溶液中に抽出することができ、ユビキノーン10高純含有不溶物を得ることができる。

【0022】

上記工程で得られるユビキノーン10高含有不溶物は、ろ過、遠心分離、膜分離などの分離操作によって溶液と分離することができる。ろ過は、ヌッチェ、フィルタープレス、バスケット分離機などで行うことができる。

上記一連の工程によって得られる不溶物に再度50～100 v/v%の濃度になるようにメタノール溶液を加え、上記一連の工程を1回以上、例えば数回繰り返すことにより、目的とする濃度のユビキノーン10含有不溶物を取得してもよい。

【0023】

上記不溶物からユビキノーン10を抽出するために用いるメタノール溶液の濃度と温度は、使用するメタノール溶液が該濃度および温度において、上記工程において分離取得される不溶物に含有されるユビキノーン10を溶解し、かつユビキノーン10以外の夾雑物質を実質的に溶解しない濃度と温度であれば、いかなる濃度と温度の組み合わせであってもよい。具体的には例えば、メタノール溶液の濃度が85～100 v/v%で濃度が30℃より高く80℃以下、より好ましくは濃度が90～100 v/v%で温度が50～70℃、さらに好ましくは濃度が95～100 v/v%で温度が60～70℃の組み合わせをあげることができる。

【0024】

上記濃度と温度でメタノール溶液を保持する方法としては、例えば攪拌機で30分間～10時間、好ましくは1～5時間、さらに好ましくは1～2時間攪拌する方法をあげることができる。該方法により、上記不溶物からユビキノーン10を抽出することができる。

上記工程により取得されるメタノール溶液から不溶物を除去することにより、ユビキノーン10含有溶液を取得することができる。不溶物を除去する方法とし

ては、ろ過、遠心分離、膜分離などの分離操作によって溶液と分離する方法をあげることができる。ろ過は、ヌッチェ、フィルタプレス、バスケット分離機などで行うことができる。

【0025】

ユビキノーン-10含有溶液からユビキノーン-10の結晶を晶析法等を用いて晶析させることにより、ユビキノーン-10の結晶を取得することができる。

本発明の方法に用いられる晶析方法としては、本発明の方法で得られるユビキノーン-10含有溶液からユビキノーン-10の結晶を晶析させることができる方法であればいかなる方法でもよいが、例えば濃縮晶析法、冷却晶析法およびそれらを組み合わせた方法等をあげることができる。

【0026】

上記晶析方法により晶析した結晶を、ろ過、遠心分離、膜分離によって溶液と分離した後、乾燥させることによりユビキノーン-10の結晶を取得することができる。得られた結晶に、85～100v/v%の濃度になるようにメタノール溶液を加え、30℃より高く80℃より低い温度に保持して該結晶を溶解させた後、上記結晶方法を1回以上、例えば数回繰り返すことにより、該結晶の純度を高めることができる。

【0027】

本発明の方法で得られるユビキノーン-10の結晶としては、ユビキノーン-10の純度が90.0%以上、好ましくは95.0%以上、より好ましくは97.0%以上、さらに好ましくは99.0%以上のユビキノーン-10の結晶をあげることができる。

以下、本発明の実施例を示すが、本実施例は本発明を限定するものではない。

【0028】

【実施例】

実施例1 ユビキノーン-10とユビキノーン-10類縁体混合物からのユビキノーン-10類縁体の効率的除去方法

以下の表1記載の組成を有する培地をpH9.0に調整し、炭酸カルシウムを1%添加した後、121℃で10分間滅菌した培地1.8Lを入れた3Lの発酵槽にユビキノーン

10生産菌であるRhodobactersphaeroides ATCC 21286を植菌し、8日間、28℃、
 攪拌回転数450rpmで培養した。表中、トレースエレメントとは、88mg/l $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 、37mg/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、8.8mg/l ZnSO_4 、270mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、7.2
 mg/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ および970mg/l $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ からなる溶液を示す。

【0029】

【表1】

組成物	濃度
蔗糖蜜	4.0 %
グルコース	2.7 %
コーンステープリーカー	4.0 %
硫酸アンモニウム	0.8 %
リン酸1カリウム	0.05 %
リン酸2カリウム	0.05 %
硫酸マグネシウム・7水和物	0.025%
硫酸第一鉄・7水和物	3.0mg/L
チアミン	8.0mg/L
ニコチン酸	8.0mg/L
トレースエレメント	1.0mL/L

【0030】

培養終了後、培養物0.3mlに20% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ を1 μ l、2-ブタノール を0.3mlお
 よびガラスビーズを0.3mlを加え、マルチビーズショッカーMB200（安井器械社製
 ）を用いて30分間振盪して菌体を破碎することにより、ユビキノナー10および
 ユビキノナー10類縁体を完全に抽出した。該破碎抽出液を15000rpmで10分間、
 遠心分離して得られる上清をHPLC分析した結果、ユビキノナー10に対する3-
 デメトキシユビキノナー10の比率は1%であった

一方、培養終了後、培養物を遠心分離により集菌して得られた湿菌体80gを水
 で3回洗浄し、洗浄菌体を取得した。該洗浄菌体に10、20、40または60℃の100v/
 v%のメタノールを500ml加え1時間攪拌した後、遠心分離し、沈殿物を取得した
 。得られた沈殿物のユビキノナー10に対する3-デメトキシユビキノナー10
 (3-dmUBD) の比率を高速液体クロマトグラフィーで分析した結果を表2に示す
 。

【0031】

【表2】

温度℃	3-dmUBD比率(%)
10	0.03
20	0.05
40	0.71
60	0.61

【0032】

上記結果から、本発明の方法を用いることにより、ユビキノーン10とユビキノーン10類縁体を含む溶液から、ユビキノーン10類縁体を効率よく除去できることが確認された。

実施例2 メタノール溶液に対するユビキノーン10の溶解度

ユビキノーン10標品（和光純薬社製）を用いて、メタノール水溶液に対するユビキノーン10の溶解度を、溶液の濃度と温度の関係において調べた。結果を図1に示す。

【0033】

ユビキノーン10の溶解度は、メタノール濃度とメタノール水溶液温度に比例して増加することが示された。

実施例3 ユビキノーン10生産菌の菌体からのユビキノーン10の精製

実施例1と同様の方法により取得したRhodobacter sphaeroides ATCC 21286の湿菌体80gを水で3回洗浄し、洗浄菌体を取得した。該洗浄菌体に抽出溶媒としてメタノール500mlを加え20℃で1時間攪拌した後、遠心分離し、夾雑物を多く含むメタノール溶液相を除いた。得られた沈殿物に対し、上記メタノール抽出操作を2回繰り返した。

【0034】

次に、再度メタノールを加えて60℃で1時間攪拌した後、ろ過により抽出液を取得した。該抽出液中には1重量部の3-デメトキシユビキノーン10に対し、99重量部のユビキノーン10が含まれていた。

該抽出液を5時間以上かけて20℃まで冷却することでユビキノーン10を析出

させ、ユビキノーン 10 の粗結晶を取得した。該結晶を40℃のメタノールに0.5g/ℓとなるように溶解した後、5時間かけて20℃まで冷却することにより、ユビキノーン 10 の結晶を取得した。該結晶の純度は99.5%であった。

【0035】

実施例 4 ユビキノーン 10 生産菌の乾燥菌体からのユビキノーン 10 の精製
実施例 1 と同様の方法で取得した培養物を遠心分離して得られた湿菌体80gに水を添加して、スラリー状態に戻した後、スプレードライヤーで乾燥菌体を取得した（水分含量2.0w/w%）。該乾燥菌体に抽出溶媒としてメタノール500mlを加え、20℃で1時間攪拌した後、遠心分離し、メタノール溶液相を除いた。得られた沈殿物に対し、上記メタノール抽出操作を2回繰り返した。

【0036】

次に、再度メタノールを加えて60℃で1時間攪拌した後、ろ過により抽出液を取得した。該抽出液中には1重量部の3-デメトキシユビキノーン 10 に対し、99重量部のユビキノーン 10 が含まれていた。

該抽出液を5時間以上かけて20℃まで冷却することでユビキノーン 10 を析出させ、ユビキノーン 10 の粗結晶を取得した。該結晶を40℃のメタノールに0.5g/ℓとなるように溶解した後、5時間以上かけて20℃まで冷却することにより、ユビキノーン 10 の結晶を取得した。該結晶の純度は99.5%であった。

【0037】

実施例 5 ユビキノーン 10 生産菌の培養物からのユビキノーン 10 の精製
実施例 1 と同様の方法で取得した培養物0.5Lにメタノール0.5Lを加え、20℃で1時間攪拌した後、遠心分離し、メタノール溶液相を除いた。得られた沈殿物に対し、上記メタノール抽出操作を3回繰り返した。

次に、再度メタノールを加えて60℃で1時間攪拌した後、ろ過により抽出液を取得した。該抽出液中には1重量部の3-デメトキシユビキノーン 10 に対し、99重量部のユビキノーン 10 が含まれていた。

【0038】

該抽出液を5時間以上かけて20℃まで冷却することでユビキノーン 10 を析出させ、ユビキノーン 10 の粗結晶を取得した。該結晶を40℃のメタノールに0.5g

ルとなるように溶解した後、5時間以上かけて20℃まで冷却することにより、ユビキノーン10の結晶を取得した。該結晶の純度は99.5%であった。

実施例6 メタノール水溶液を用いたユビキノーン10の精製

実施例1と同様の方法で取得した培養物を遠心分離して得られた湿菌体80gを水で洗浄して洗浄菌体を取得した。該菌体に80v/v%のメタノール水溶液を添加し、20℃で1時間攪拌した後、遠心分離し、メタノール溶液相を除いた。得られた沈殿物に対し、上記メタノール抽出操作を5回繰り返した。

【0039】

次に、95v/v%メタノール溶液を添加して60℃で1時間攪拌した後、ろ過により抽出液を取得した。該抽出液中には1重量部の3-デメトキシユビキノーン10に対し、99重量部のユビキノーン10が含まれていた。

該抽出液を5時間以上かけて20℃まで冷却することでユビキノーン10を析出させ、ユビキノーン10の粗結晶を取得した。次に該結晶を40℃のメタノールに0.5g/Lとなるように溶解した後、5時間以上かけて20℃まで冷却することにより、ユビキノーン10の結晶を取得した。該結晶の純度は99.5%であった。

【0040】

実施例7 ユビキノーン10の粗精製物からのユビキノーン10の精製

実施例1と同様の方法で取得した培養物を遠心分離して得られた湿菌体を常法に従い2-ブタノールを用いてユビキノーン10を抽出し、該抽出液に含有されるユビキノーン10を常法に従い合成吸着樹脂に吸脱着させて得られるユビキノーン10含有画分を濃縮晶析することにより純度82.9%のユビキノーン10の粗精製物を取得した。該粗精製物に80v/v%の含水メタノール溶液を添加し、20℃で1時間攪拌した後、遠心分離し、メタノール溶液相を除いた。得られた沈殿物に対し、上記メタノール抽出操作を5回繰り返した。

【0041】

次に、95v/v%メタノール溶液を添加して60℃で1時間攪拌した後、ろ過により抽出液を取得した。該抽出液中には1重量部の3-デメトキシユビキノーン10に対し、99重量部のユビキノーン10が含まれていた。

該抽出液を5時間以上かけて20℃まで冷却することでユビキノーン10を析出

させ、ユビキノーン 10 の粗結晶を取得した。次に該結晶を 40℃ のメタノールに 0.5g/L となるように溶解した後、5 時間以上かけて 20℃ まで冷却することにより、ユビキノーン 10 の結晶を取得した。該結晶の純度は 99.5% であった。

【0042】

【発明の効果】

本発明の方法によれば、ユビキノーン 10 を生産する能力を有する微生物の培養物、該培養物の処理物、またはユビキノーン 10 粗精製物から高純度のユビキノーン 10 を安価に精製することができる。

【0043】

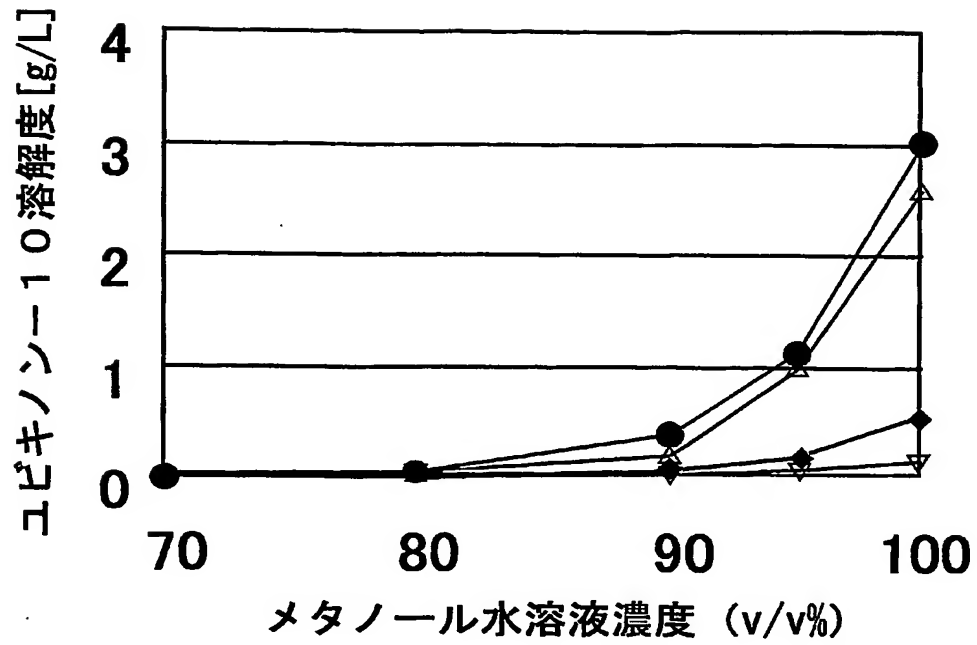
【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、メタノール水溶液に対するユビキノーン 10 の溶解度を表す図である。図中、●はメタノール水溶液温度 70℃、△は 50℃、◆は 30℃、▽は 20℃におけるユビキノーン 10 の溶解度を示す。

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 ユビキノン-10の効率的で安価な精製方法を提供する。

【解決手段】 本発明によれば、以下の工程、

[1] ユビキノン-10を生産する能力を有する微生物を培地に培養して得られる培養物、該培養物の処理物、またはユビキノン-10の粗精製物に、50～100 v/v %の濃度になるようにメタノール溶液を加え、0以上30℃以下の温度に保持する工程、

[2] 工程[1]で得られる溶液から不溶物を分離取得する工程、

[3] 工程[2]で得られる不溶物に、85～100 v/v %の濃度のメタノール溶液を加え、30℃より高く80℃以下の温度に保持する工程、および

[4] 工程[3]で得られる溶液から不溶物を除去する工程、
を含むユビキノン-10含有溶液の製造方法が提供される。

【選択図】 なし

特願 2002-217159

出願人履歴情報

識別番号

[000001029]

1. 変更年月日

1990年 8月 6日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名

協和醗酵工業株式会社

2. 変更年月日

2003年 4月25日

[変更理由]

名称変更

住所変更

住 所

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名

協和醗酵工業株式会社